动 物 学 研 究 2003, Feb. 24 (1): 73~78 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

读书报告

动物克隆机理研究进展

杨彩侠，陈大元[1]
（中国科学院动物研究所 生殖生物学国家重点实验室，北京 100080）

摘要：目前动物克隆技术的应用因低效和后代生长发育异常等缺陷而受到限制。问题的根源在于对克隆基础的分子机理缺乏了解。为更好地了解该领域当前的进展，我们研读了相关的文献，包括核移植过程中核质互作、核重编程、线粒体命运、端粒变化以及X染色体失活等机理方面的著述。看来，生物芯片等新兴技术的应用将有助于问题的解决。

关键词：动物克隆；分子机理；核重编程；重构胚
中图分类号：Q81 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2003)01-0073-06

Advances in the Mechanism of Animal Cloning

YANG Cai-xia, CHEN Da-yuan
(*State Key Laboratory of Reproductive Biology*, *Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100080, *China*)

Abstract: Application of animal cloning is limited with especially low efficiency and birth defect cloned offspring. This is because molecular mechanism underlying animal cloning is not well known. For better understanding of current progress in this field, we gathered reports on molecular ways affecting the success of animal cloning, such as nuclear-cytoplasm interaction, epigenetic reprogramming, mitochondrial fate, telomere changing and X chromosome inactivation, etc. It looks as if the application of some new techniques such as bio-CMOS chip would help resolving the problems.

Key words: Animal cloning; Molecular mechanism; Nuclear reprogramming; Reconstructed embryo

随着许多哺乳动物被成功克隆（多种动物：Wilmut et al, 1997；鼠：Wakayama et al, 1998；牛：Cibelli et al, 1998；猕猴：Wolf et al, 1999；猪：Polejaeva et al, 2000），克隆技术在动物生产、医学研究和濒危动物保护等方面的应用价值越来越明显；虽然动物克隆的效率还很低下，而且许多克隆动物胎儿过度生长，出生前死亡，出生后生长异常，或出现某些难于解释的病理反应。例如，一些克隆小牛出生后发生肺气肿和呼吸衰竭，或在4月龄时因注射疫苗引起发热，但却没有表现出遗传缺陷、免疫低下、过度肥胖等异常的现象（Lanza et al, 2001）。为了探寻影响动物克隆效率的原因，研究者们从克隆技术、克隆物种，以及与动物生长发育有关的基因在克隆动物中的表达情况等多个角度，对核质互作、核重编程等多个方面进行了研究。这些研究，又推动了动物发育学、遗传学、生理生化、分子生物学等相关学科的发展。

生物学的许多问题必须通过在分子水平的工作来解决。在供体核移植入卵母细胞或卵受精的过程中，核重编程如何决定重构胚发育最终命运的分子机制的研究，引起了研究者们广泛的兴趣。可是迄今为止，对于动物克隆分子机制的了解仍很贫乏。看来克隆过程中实际发生的生物学变化，以及核重编程是否正确等应是今后研究的重点课题。

收稿日期：2002-07-15；接受日期：2002-09-20
基金项目：科技部攀登专项（95-专-08）；中国科学院知识创新工程重大项目（KSCX1-05-01）；国家自然科学基金重点项目（39830280）

1. 通讯作者，Tel：010-62560528，E-mail：chendy@panda.ioz.ac.cn

1 细胞核、细胞质及其互作

1.1 核质互作

Gurdon（1966）将爪蟾（*Xenopus*）的体细胞核移入卵中，首次研究了基因活动的特定变化，包括rRNA基因转录调控。体细胞核在移植前转录rRNA基因，但在移入卵后，核仁消失，rRNA基因也失活。然而随着胚胎的发育，rRNA基因活性恢复，核仁重现。这表明卵细胞质对核活性有强大的重构效应。

事实上，核重编程同体细胞供体核移入卵（母）细胞或受精卵中造成的蛋白质交换是相联系的。许多细胞质因子，如核质蛋白、组蛋白（去）乙酰化酶、DNA甲基化/去甲基化酶、染色质重构复合物、细胞周期调控蛋白（CDK/cyclin）、DNA复制装置、组蛋白H4和HMG1等可以进入核内，再加上核内转录因子，如异染色质蛋白、组蛋白H1等输出核外，引起染色质解凝聚（de-condensation），核小体不稳定化，连接组蛋白交换，以及调控蛋白从染色质上脱离（Kikyo & Wolffe，2000）。移植后，卵细胞质中的大量蛋白质移入细胞核，同核增殖和体细胞核中异染色质的显著减少相伴。超过75%的原已存在的蛋白质从体细胞核中丢失。这样，体细胞核的重新编程涉及到染色质成分的大量交换。卵细胞生发泡中有大量核成分，包含分子伴侣（molecular chaperone）如核质蛋白（nucleoplasmin）N1/N2，都对体细胞核重构有重要作用。这些分子伴侣能够介导核心组蛋白的转移，并与DNA结合形成核小体。受精后，核质蛋白也介导对精子特异的富含精氨酸的鱼精蛋白从精子染色质上移除，并有助于组蛋白H2A和H2B与染色质的结合。核质蛋白磷酸化出现在卵母细胞成熟过程中，这种磷酸化形式对移除精子鱼精蛋白和解聚精子染色质更有效，有助于父系原核形成。

1.2 线粒体

将不同哺乳动物的体细胞核移入牛的卵细胞质中，发现受体细胞质支持胚胎发育，而不管供体是何物种，以及它们所提供的成纤维细胞染色体数或年龄（Dominko et al，1999）。这表明哺乳动物调控早期胚胎发育的机制是保守的。

细胞质中胞质因子移入核内，以及转录因子移出核外，不仅影响了核内染色体的活动，还影响了细胞质中细胞器发育所需因子的表达。在动物克隆研究中，细胞质中线粒体（包括供体和受体两种来源）的变化也是研究者关心的热点问题之一。克隆Dolly采用的是电融合技术，即完整的体细胞与去核的卵母细胞融合的方法。该方法至今仍被广泛应用，但存在一个大的缺点，即在核移植时把供体细胞的线粒体也带入受体细胞内。由于线粒体也含有遗传物质DNA，这些供体细胞的线粒体在卵细胞线粒体的存在下，命运会怎样变化呢？如果供体细胞和受体细胞的线粒体都被复制，将导致线粒体的异质性（mitochondrial heteroplasmy）（Guo & Jin，2001）。若其中一种来源的线粒体被选择性地复制，而另外一种被选择性地破坏，则存在另外两种可能：供体来源的线粒体逐渐消失，仅受体的线粒体存在；或受体来源的线粒体逐渐消失，最后只有供体的线粒体存在。

在同种克隆中，Steinborn et al（2000）分析了分别利用原代胚胎成纤维细胞、成年牛成纤维细胞或成年牛乳腺上皮细胞克隆的10头牛的线粒体DNA，发现7头牛有来源于供体细胞的线粒体，所占比例在4‰~4%，而且这种比例在不同的组织中，在整个胚胎发育过程中直至妊娠期满都非常稳定；在另外3头牛中，供体的线粒体很少甚至没有。体内有两种不同来源线粒体共存的克隆牛也能存活和正常发育。而Evans et al（1999）检测了包括Dolly在内的10只克隆绵羊的线粒体DNA，却未找到来源于供体细胞的线粒体DNA，结果是10只绵羊细胞的线粒体DNA都来源于受体卵母细胞。他们认为这种现象是受体卵母细胞主动破坏供体细胞线粒体的一种机制造成的，这种机制类似于正常受精过程中精子来源的线粒体被破坏的机制。至于为什么在克隆牛和克隆绵羊间线粒体存在状态不一致，其原因之一可能与品种间差异有关。在异种克隆产生的胚胎中，研究者对其线粒体存在状态的报道也不一致。Lanza et al（2000a，b）分析了野牛-家牛异种核移植得到的野牛胎儿的线粒体来源，结果发现均来自受体（家牛）的卵母细胞。Loi et al（2001）对异种克隆盘羊的线粒体进行分析的结果表明，线粒体完全来源于受体的卵母细胞。而我们实验室检测了大熊猫-兔重构胚及其在家猫子宫中着床后的胎儿线粒体，发现着床前胚胎中供体和受体来源的线粒体共存；植入后大熊猫的线粒体占据主导地位（Chen，2000；Chen et al，2002）。

1.3 细胞核

1.3.1 核重编程　核重编程的过程就是使在体细胞中被关闭、而在正常胚胎发育中表达的基因重新被激活的过程。Rideout et al（2001）认为重编程有三种可能的结果：供核基因组完全没有进行重编程，重构胚很快死亡；部分重编程，重构胚在不同发育阶段死亡；完全重编程，产生正常的克隆动物。由此可见，完全的重编程是成功产生克隆动物的先决条件。

用分化体细胞进行动物克隆充分证明，细胞去分化是可行的。去分化过程伴随着基因组水平的后生重编程（epigenetic reprogramming），包括与染色质相关的其他蛋白（如连接组蛋白、转录因子）的重构、基因组甲基化变化、组蛋白组装及核小体形成等不同形式。在该过程中出现任何差错都会导致克隆胚胎或动物的不同畸形发育。染色质解聚是一个耗能的过程，这个过程不仅对核重编程可能是必须的，同时还可能涉及到正常驱动有丝分裂染色体凝聚的引擎装置，如与染色体稳定和维持（stability and maintenance of chromosome，SMC）相关的 ATP 酶或 DNA 聚合酶，或一些染色质重构特异性 SWI2/SNF2 超家族成分。体细胞克隆需要染色体结构的显著性重构。许多蛋白质从供体核中丢失，其他一些蛋白质由卵细胞质中进入供体核中。在体外重建这种交换的过程中，染色质重构核小体 ATP 酶（ISWI）是关键分子，它解除 TATA 框结合蛋白（TBP）与核基质的联系状态，而这种联系状态的去除意味着蛋白质将从重构胚的核中释放出来（Kikyo et al，2001）。

核重编程涉及到基因组 DNA 甲基/去甲基化和组蛋白乙酰化（Ferguson-Smith & Surani，2001）。DNA 甲基化是基因组后生遗传修饰和基因组功能调节的主要手段。哺乳动物通过基因组甲基化来改变 DNA 与蛋白质间的作用，提供非编码序列（包括内含子、重复序列，以及一些蕴藏着的活性转座成分）和发育相关基因沉默的可遗传机制。核重编程需要打破这种基因沉默的状态，恢复基因活性，而且必须在一个特定的短暂的时期，即供体核移入后到重构胚基因转录前在受体卵细胞质内完成。这显然与正常两性配子在受精前各自发生后生重编程不同。在正常受精或体细胞核移植的猪移植前胚胎中，基因组甲基化/去甲基化状态与着丝粒部位的基因组微卫星和 PRE-1 短散布重复序列（SINE）有关。在供体基因组的这些重复序列中可鉴定到典型的去甲基化过程，这与在受精卵中检测到的情形相似，但与早期观察到的克隆牛胚胎中的表现有所不同，牛供体基因组重复序列区表现出异常的甲基化模式。这表明供体基因组的后生遗传状态具种间特异性（Kang et al，2001）。

1.3.2 X 染色体失活　在哺乳动物和果蝇中，X 染色体剂量补偿机制在进化意义上是不相关的，但在调控策略上却惊人地相似，其中包括非编码 RNA 和染色质修饰的获得性遗传扩展。X 染色体剂量补偿机制的获得性遗传表明，可能存在一种调节整条染色体的快速进化的机制。这种变化可以通过选择性定位染色质重构装置的位置进行研究，该装置可从原始进入位点按顺式长距离移动（Park & Kuroda，2001）。

在哺乳动物中最初报道，X 染色体失活由 X 染色体失活特定转录物基因 *Xist*（inactive X-specific transcript）和它的反义基因 *Tsix* 共同顺式调控，两者都作用于 X 染色体上的选择/印迹中心。其中 *Xist* 转录出不翻译的 RNA，同 X 染色体上的相应 DNA 序列互补，对 X 染色体失活的起始是必须的。若将 *Xist* 基因转入常染色体，能使 DNA 甲基化，组蛋白高乙酰化，复制延迟，另一种组蛋白（macroH2A）聚集，并可使远距离连锁基因失活，这些都是内源性失活 X 染色体的特点。*Tsix* 则负责选择性地将一条 X 染色体的选择/印迹中心敲除，使该 X 染色体失活。而果蝇的 *roX*1 和 *roX*2 基因对 X 染色体的失活有着类似的作用。

最近，Science 周刊报道了 X 染色体失活研究的最新进展（Chao et al，2002）。转录因子 CTCF 可以作为一个反式作用的候选因子，对 X 染色体的选择性失活起作用。选择/印迹中心包含有串联的 CTCF 结合位点，在增强子阻断中可以发挥功能。*Tsix* 基因和 CTCF 共同组成了 X 染色体失活调控的获得性转换装置。

Eggan et al（2000）监控克隆鼠胚胎中的 X 染色体失活，进而研究克隆过程是否重设雌性体细胞核中的两条 X 染色体的获得性遗传差异状态。两条 X 染色体在克隆胚胎分裂时都有活性，随后在有些胚胎中发生一条 X 染色体的随机失活。在滋养层外皮细胞，X 染色体失活是非随机性的，供体体细胞的 X 染色体被特定性选择失活。但在用具有两条处于活性状态的 X 染色体的雌性胚胎干细胞作为供体时，则发生了滋养层外皮细胞和胚胎的随机性 X 染

色体失活。这些结果表明，在克隆过程中，获得性标记能够被移除，并且可以在任意一条 X 染色体上重新建立。在配子发生过程中，负责正常印迹性滋养层外皮细胞中的 X 染色体失活的获得性遗传标记，同体细胞 X 染色体失活过程中加于失活 X 染色体上的获得性遗传标记在功能上是一致的。最终，由含有两条无获得性遗传标记的活性 X 染色体的胚胎干细胞获得的克隆，在滋养外皮细胞层和上皮细胞系中表现出随机 X 染色体失活。同时，随机 X 染色体失活而不是印迹的 X 染色体失活，出现在没有获得性遗传修饰的体细胞或配子中。

1.3.3 端粒 在细胞分化过程中，核重编程须去除染色质上的获得性修饰。对牛体细胞核移植获得的克隆胚胎、胎儿和新生幼畜的端粒酶活性和端粒长度的研究表明，与胚胎干细胞样细胞相比，端粒酶活性在成纤维供体细胞中显著降低，而胎儿成纤维细胞则比成年动物的要高 16 倍。用血清饥饿法进行细胞培养和传代，与不经处理的早期传代细胞相比，端粒酶活性降低 30% ~ 50%。体外培养牛胎儿成纤维细胞和胚胎干细胞样细胞晚期传代中发现了端粒缩短。克隆后胚胎发育到囊胚期端粒酶活性的重编程十分明显，导致克隆胎儿和新生幼畜的端粒延长 15 ~ 23 kb，而在成年供体细胞中则相对较短。可见，克隆胚胎可以遗传供体核在体内外过程中所获的基因组修饰，但是随后在克隆动物发育过程中发生逆转（Betts et al，2001）。

衰老细胞核移植也可延长寿命。一个反映细胞寿命的基因——早期群体扩增水平互补 DNA-1 (EPC-1)，在克隆动物细胞中的表达比相应对照组细胞要高 3.5 到 5 倍。Southern 杂交和流式细胞仪分析表明，端粒在这些新生克隆动物中也得到了延长（Lanza et al，2000a，b）。

1.3.4 供体核同质性或异质性 用具有近交或 F_1 代遗传背景的胚胎干细胞来核移植克隆鼠，检测供体细胞核异质性是否为决定克隆动物存活时间长短的因素；再用单 ES 细胞所获的囊胚，或仅用四倍体囊胚中的内质层细胞来克隆鼠，比较是技术原因还是 ES 细胞系特性造成结果不同。所用的 5 个 F_1 代 ES 细胞系克隆的大多数动物活到成年，胚胎和新生儿体重也正常；相反，与其他近交克隆一样，用近交 ES 细胞系克隆的鼠则因呼吸衰竭，出生后即死亡，胚胎和新生儿体重也表现异常。可见，遗传异质性是鼠出生成活率高低的决定性因素，不管该克隆鼠是用 ES 细胞还是用四倍体胚胎获得。另外，用 F_1 代 ES 细胞的四倍体胚胎可以简单有效地获得遗传完全一致的克隆动物，而不需要嵌合体中间物的参与（Eggan et al，2000）。

2 细胞周期

2.1 受体胞质中 MPF 的水平

供体核与受体细胞质的同步化对核移植成功是十分关键的。许多细胞周期激酶负责核膜破裂和早熟染色体凝聚，如成熟/有丝分裂/减数分裂促进因子（maturation/mitosis/meiosis promoting factor，MPF）——由周期素 B（cyclin）和 $p34^{cdc2}$组成的复合物。作为一个蛋白激酶，MPF 的活性受自身磷酸化/去磷酸化的状态所调控，其含量水平在细胞周期和成熟的不同阶段也会发生变化。在所有动物中，MPF 水平在 G2 期过渡到 M 期时升高，而在后期和末期降低，然后又在第二次减数分裂中期增高。在受精或卵细胞激活时，MPF 活性急剧下降，导致细胞减数分裂：出现了核膜重建、染色体解凝聚和细胞骨架结构重整等现象，于是细胞形态便发生了变化。因而欲使核移植后细胞正常活动，必须降低 MPF 水平。否则，染色体损坏或异倍体化率将会很高(Campbell et al，1996；Campbell，1999)。

通过把处于 G0/G1 或 M 期的供体细胞移植入去核的 MⅡ期卵子中，已经产生了多种克隆动物。以 MⅡ期卵作为受体，主要是因为其 MPF 的水平较高，可引起移入核的核膜破裂（nuclear envelope breakdown，NEBD）和早熟染色体凝集（premature chromosome condensation，PCC），从而保证供体核 DNA 的正确复制和重编程。协调供体细胞与受体胞质的细胞周期对维持重构胚胎的正确染色体倍数和阻止 DNA 损伤是必要的。不同供体与受体细胞周期阶段的组合能够阻止 DNA 损坏和不协调复制，导致假原核的形成。使用 M 期卵细胞被认为能促进供体遗传物质的重编程，究其原因是因核膜破裂，早期染色体凝聚的出现，将供体染色质暴露在与早期发育有关的受体细胞质因子之中（Polejaeva et al，2000）。Miyoshi et al（2001）比较了体细胞分别移入去核的 MⅠ和 MⅡ期卵后形成的重构猪胚胎在体外的发育能力，结果表明 MⅠ期卵同样可以作为核移植的受体，这可能与 MⅠ期是卵成熟过程中又一 MPF 高峰期有关。

2.2 供体核细胞周期

除了MPF水平外，供体核所处细胞周期的阶段亦可能影响克隆的结果，因此也受到广泛地关注。细胞核周期同步化技术，如血清饥饿法使供体细胞处于静止或G0期，才促成了体细胞克隆羊的成功（Wilmut et al，1997)。不过，牛胎儿非静止期成纤维细胞被成功的使用表明，让细胞处于静止期并不是必须的（Cibelli et al，1998)。处于G0/G1期的卵丘细胞也被成功用于克隆鼠研究中（Wakayama et al，1998)。我们实验室也做了关于“G0期假定”是否成立的一些验证工作。Liu et al（1999a，b）用牛耳成纤维细胞经非休眠处理用于核移植表明，融合后重组卵至少能进行早期发育。另外，Li et al（2001）将非休眠的大熊猫体细胞经连续核移植证明，未经休眠的体细胞核也能支持异种重构胚的早期发育。

3 动物发育相关基因和基因簇

与动物生长发育相关最典型的就是同源框（homeobox）基因簇，它成梯度地按横轴、纵轴表达，形成时空顺序，对动物受精卵和胚胎发育成正常个体具有重要作用。在哺乳动物中还存在另外一些与发育相关的重要基因和基因簇，如Oct4、成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）、白介素（interleukin，IL）和哺乳动物检验点基因（mammalian checkpoint gene）Chk1等（Boiani et al，2002；Pesce & Scholer，2001；Daniels et al，2001；Elledge et al，2001)。

研究发育相关基因或基因簇与克隆动物生长发育的关系，可以使我们对影响动物克隆效率的因素有所了解。为了将克隆动物成活率或胎儿过度生长同基因表达联系起来，Humpherys et al（2001）研究了经核移植或经胚胎干细胞克隆所获得的鼠的印迹基因（imprinted gene）表达情况，发现ES细胞基因组的后生状态（epigenetic status）处于非常不稳定的状态。大多数克隆鼠的印迹基因表达存在差异，即使用相同亚克隆的ES细胞也出现相同情形。许多成活的克隆动物有大量的基因异常调控，这表明哺乳动物可以忍受基因组中的许多获得性遗传变异，一定程度上也解释了即使表现正常的克隆动物，也有可能基因表达异常。Daniels et al（2001）用分析胚胎基因组基因表达的方法，评价核移植胚胎的成活率。他们不但采用RT-PCR方法检测了用牛颗粒细胞经核移植获得的胚胎的FGF4、FGFr2和IL6基因的异常表达（这些基因可以用于反映体内限制性的发育潜能），还用胎儿上皮细胞核经核移植构建的胚胎来分析不同供体细胞核对胚胎基因表达的影响；此外，还比较了这些基因在经细胞融合或直接注射得到的牛核移植胚胎中的表达情况。在被分析的核移植胚胎中，FGFr2和IL6转录物的水平类似于经体外受精获得胚胎的水平；但FGF4在大多数胚胎中显然不存在转录物，特别是在那些供体核转移后立即发育激活的胚胎中。由此可见，不同供体细胞系和不同核移植程序对核移植生成的胚胎中与发育相关的基因或基因簇的表达有影响；而动物克隆过程中，重构胚的正常发育需要这些基因或基因簇的正常表达；因此，对它们的研究可能会提高动物克隆的效率。

4 结 语

动物克隆是动物基因组整体规模上的一项工程，须要了解并掌握影响克隆效率、发育异常等的分子机制。随着人类基因组与动物基因组计划的实施与完成，把生物芯片（Aronow et al，2001)、二维凝胶电泳和质谱技术等一些新兴的研究方法应用于动物克隆的机理研究之中，那么，令动物克隆界困扰的克隆效率等一系列问题有望得到解决。

参考文献：

Aronow BJ, Richardson BD, Handwerger S, et al. 2001. Microarray analysis of trophoblast differentiation: Gene expression reprogramming in key gene function categories [J]. *Physiol. Genomics*, **6** (2): 105-116.

Betts DH, Bordignon V, Hill JR, et al. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle [J]. *PNAS*, **98**: 1077-1082.

Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, et al. 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency [J]. *Genes & Development*, **16**: 1209-1219.

Campbell KH. 1999. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle [J]. *Cloning*, **1**: 3-15.

Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, et al. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer [J]. *Rev. Reprod.*, **1**: 40-46.

Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, et al. 2002. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice [J]. *Science*, **295**: 345-347.

Chen DY. 2000. Achievement of giant panda cloning [J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, **2**: 120-121. [陈大元. 2000. 克隆大熊猫取得阶段性成果. 中国科学院院刊, **2**: 120-121.]

Chen DY, Wen DC, Zhang YP, et al. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos [J]. *Biol. Reprod.*, **67**: 637-642.

Cibelli JB, Stice SL, Golucke PJ, et al. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [J]. *Science*, **280**: 1256-1258.

Daniels R, Hall VJ, French AJ, et al. 2001. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **60** (3): 281-288.

Dominko T, Mitalipova M, Haley B, et al. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species [J]. *Biol. Reprod.*, **60**: 1496-1502.

Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, et al. 2000. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos [J]. *Science*, **290**: 1578-1581.

Elledge SJ, Sanchez Y. 2001. Mammlian Checkpoint Genes and Proteins [P]. US patents 6307015. US patent & trademark office.

Evans MJ, Gurer C, Loike JD, et al. 1999. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep [J]. *Nature Genetics*, **23** (1): 90-93.

Ferguson-Smith AC, Surani MA. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes [J]. *Science*, **293**: 1086-1089.

Guo ZR, Jin NY. 2001. Advances in animal cloning and related fields in 2000 [J]. *Journal of Chinese Animal Veterinary*, **21** (2): 208-212. [郭志儒, 金宁一. 2001. 2000年动物克隆及相关领域研究新进展. 中国兽医学报, **21** (2): 208-212.]

Gurdon JB. 1966. The cytoplasmic control of gene activity [J]. *Endeavour*, **25** (95): 95-99.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, et al. 2001. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice [J]. *Science*, **293**: 95-97.

Kang YK, Koo DB, Park JS, et al. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos [J]. *Nature Genetics*, **28**: 173-177.

Kikyo N, Wolffe AP. 2000. Reprogramming nuclei: Insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons [J]. *Journal of Cell Science*, **113**: 11-20.

Kikyo N, Wade PA, Guschin D, et al. 2001. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI [J]. *Science*, **289**: 2360-2367.

Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, et al. 2000a. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells [J]. *Science*, **288**: 586-587.

Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, et al. 2000b. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer [J]. *Cloning*, **2** (2): 79-90.

Lanza RP, Cibelli JB, Faber D, et al. 2001. Cloned cattle can be healthy and normal [J]. *Science*, **294**: 1893-1894.

Li JS, Chen DY, Han ZM, et al. 2001. Influence of continuous nuclear transfer on embryo development of giant panda with cross-species cloning [J]. *Science Bulletin*, **46** (22): 1899-1901. [李劲松, 陈大元, 韩之明, 等. 2001. 连续核移植对异种克隆大熊猫胚胎发育的影响. 科学通报, **46** (22): 1899-1901.]

Liu JL, Wang MK, Li JS, et al. 1999a. Culture of bovine fibroblast in the ear [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **45** (4): 472-473. [刘冀珑, 王敏康, 李劲松, 等. 1999a. 牛耳成纤维细胞的培养. 动物学报, **45** (4): 472-473.]

Liu JL, Wamg MK, Lian L, et al. 1999b. Nuclear transfer of the bovine adult non-dorminant fibroblast in the ear [J]. *Science Bulletin*, **44** (12): 1284-1287. [刘冀珑, 王敏康, 廉 莉, 等. 1999. 非休眠期成年牛耳成纤维细胞用于核移植. 科学通报, **44** (12): 1284-1287.]

Loi P, Ptak G, Barboni B, et al. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells [J]. *Nat. Biotechnol.*, **19** (10): 962-964.

Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Gibbons JR, et al. 2001. Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase Ⅰ and Ⅱ oocytes matured in a protein-free medium [J]. *BMC Development Biology*, **1**: 12.

Park Y, Kuroda MI. 2001. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation [J]. *Science*, **293**: 1083-1085.

Pesce M, Scholer H. 2001. Oct4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development [J]. *Stem Cells*, **19**: 271-278.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, et al. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nature*, **407**: 86-90.

Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R, et al. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome [J]. *Science*, **293**: 1093-1098.

Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, et al. 2000. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning [J]. *Nature Genetics*, **25** (3): 255-257.

Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, et al. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, **394**: 369-374.

Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, **385**: 810-813.

Wolf DP, Meng L, Ouhibi N, et al. 1999. Nuclear transfer in the Rhesus monkey: Practical and basic implications [J]. *Biology of Reproduction*, **60**: 199-204.